

## 増幅産物の検出と標識

### 6 PCR産物の標識

牧野鈴子

PCR産物を標識するには、一般的に放射性同位元素や蛍光色素などが用いられる。プライマーの5'末端をこれらいずれかで標識し、PCRに用いると、5'末端のみが標識されたDNA断片が合成される。これに対して、標識ヌクレオチドを用いてPCRを行なうと内部がランダムに標識されたDNA断片が増幅される。いずれの場合も、増幅されたDNA断片を高感度で検出することができるので、PCRを用いたいろいろな解析に利用できる。

**Key words** 【 $^{32}\text{P}$  標識】【蛍光標識】【標識プライマー】

はじめに PCR法により増幅されたDNA断片を検出するためには、通常PCR産物をNuSieveアガロースゲルなどで電気泳動したのち、エチジウムブロミドで染色するという方法が用いられている。増幅されたDNA断片の有無を調べるような検索にはこの検出方法で十分である。しかし、エチジウムブロミド染色によるDNA断片の検出は感度が悪く、また、アガロースゲルを用いた電気泳動ではバンドの分離能も十分ではない。そのため、PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism) 法、AP (arbitrary primed)-PCR法などでPCR産物の解析を行なうような場合にはこの検出法は適さない。これらの解析を行なうためには、PCR産物を放射性同位元素または蛍光色素などで標識し、PCR産物をより感度よく検出できるようにすればよい。また、PCR法を用いて定量を行なう場合にも、放射性同位元素などによりPCR産物を標識する方法が用いられる。ほかにもビオチンやジゴキシゲニンなどを用いてPCR産物を標識する方法もあるが、ここでは一般的によく用いられている放射性同位元素または蛍光色素によるPCR産物の標

識法について述べる。

#### I. 放射性同位元素による標識

放射性同位元素を用いてPCR産物を標識する方法としては、図1に示すような2種類の方法がある。

(1) 5'末端を標識したプライマーを用いてPCRを行なう方法(末端標識)。この場合、合成されたDNA断片の5'末端のみが標識される。

(2) 標識ヌクレオチドをPCRの反応中にTaq DNAポリメラーゼにより取り込ませる方法(内部標識)。この場合、DNA断片の内部にランダムに標識が入る。

PCR産物の鎖長により異なるが、数百bpの場合は標識プライマーを用いたほうが、合成されたDNA断片の放射活性は高くなる。放射線同位元素で標識されたPCR産物はポリアクリルアミドゲル(厚さ0.3mm)で電気泳動しゲルドライヤーで乾燥したのち、オートラジオグラフィーにより検出する。

なお、 $^{35}\text{S}$ で標識された化合物を用いてPCRを行なうと、加熱により気化性の $^{35}\text{S}$ 化合物が生成される危険

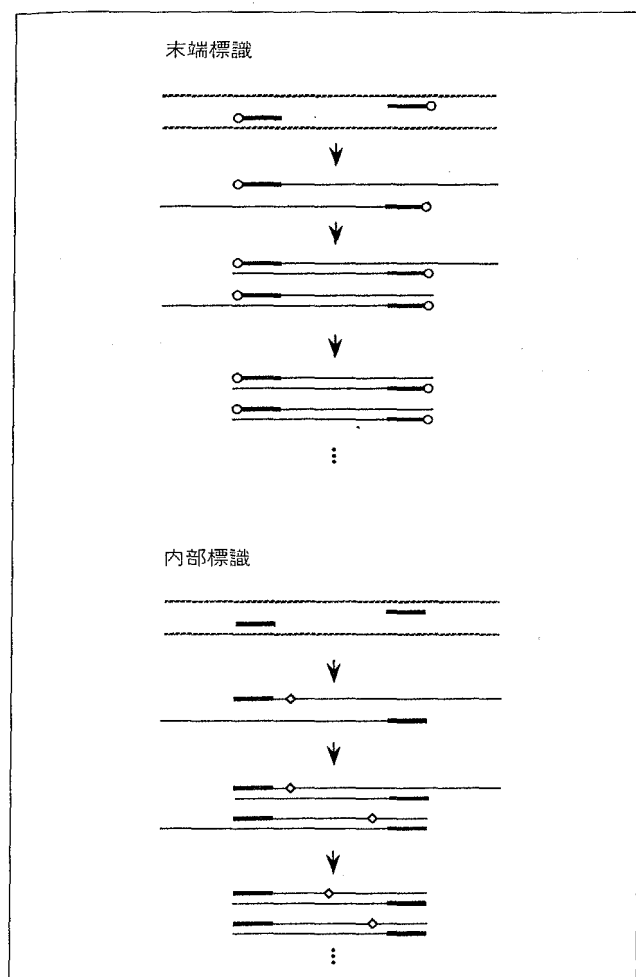


図1 PCR産物の放射性同位元素または蛍光色素による標識法

----: 鋳型, O: 5'末端が標識されたプライマー, ◇: 標識ヌクレオチド。

性があるという報告があるので、PCRを行なう際には $^{32}\text{P}$ や $^{33}\text{P}$ による標識を用いたほうがよい<sup>1,2)</sup>。

## 1. 放射性同位元素で標識したPCR産物の生成

### A. プライマーの標識<sup>3)</sup>

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの5'末端をポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてリン酸化反応にて $^{32}\text{P}$ 標識する。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は高濃度品を用いる。

この標識プライマー法は多くの試料を解析するとき用いると標識ヌクレオチドを用いるより経済的である。また、放射線の比活性が高いので、ゲルシフト法などに用いるプローブの作製にも使用できる。なお、

PCRに用いるプライマーセットのうち片方のプライマーのみを標識すると、片側鎖だけが標識されたDNA断片を合成することができるので、DNAフットプリント法やメチル化干渉法のプローブにも使用できる<sup>4)</sup>。

### 【標識例】(20試料分)

5'側標識プライマー (5 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
3'側標識プライマー (5 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>6000 Ci/mmol)	1.2 $\mu\text{l}$
10×キナーゼ緩衝液 (0.5 M トリス塩酸, pH 8.3, 0.1 M $\text{MgCl}_2$ , 0.05 M ジチオスレイトール)	0.4 $\mu\text{l}$
水	1.0 $\mu\text{l}$
T4ポリヌクレオキナーゼ	0.4 $\mu\text{l}$

37°Cで30分反応したのち、65°Cで5分間加熱し、酵素を失活させる。これに

10×PCR緩衝液	135 $\mu\text{l}$
水	20 $\mu\text{l}$
1.25 mM ヌクレオチド混合液	20 $\mu\text{l}$

を加え-20°Cで保存すると約2週間は使用できる。一度に多量のプライマーを標識し保存しておくとお便利である。

なお、使用時にTaq DNAポリメラーゼを2  $\mu\text{l}$ 加えたのち、チューブに9  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、鋳型のDNA 1  $\mu\text{l}$ を加え、PCRの反応を行なう。

### B. 標識ヌクレオチドによるPCR産物の標識<sup>5)</sup>

PCRの反応液中に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を加え、DNA合成のときに分子内に取り込ませる。

この方法は試料数が少ない場合、または1つの試料に対して何種類ものプライマーを用いる場合に使うと便利である。

### 【標識例】(1反応あたり)

5'側プライマー (10 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
3'側プライマー (10 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
10×PCR緩衝液	1.0 $\mu\text{l}$
1.25 mM ヌクレオチド混合液	1.6 $\mu\text{l}$
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3,000 Ci/mmol)	0.2~0.5 $\mu\text{l}$
水	3.9~4.2 $\mu\text{l}$
Taq DNAポリメラーゼ	0.05 $\mu\text{l}$

試料数の分だけ混合し、分注する。鋳型のDNAを1  $\mu\text{l}$ 加え、PCRを行なう。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の量は適当に調製する。

## 2. 放射性同位元素で標識された PCR 産物の解析

標識プライマーまたは標識ヌクレオチドを用いて PCR を行ない、ポリアクリルアミドゲルで解析した例を示す(図 2)。通常は PCR 産物のみが検出できるように泳動すればよいが、ここに示すように、ごく短時間、電気泳動することにより、未反応の標識化合物( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP), 標識されたプライマー, PCR 産物などを一度に検出することも可能である。このような解析を行なうと  $^{32}\text{P}$  による標識の効率や副産物の生成具合も一目でわかるので、たいへんわかりやすい。

たとえば、標識プライマーを用いた PCR を行なった場合、プライマーの標識効率も PCR 産物の検出には影響を与える。もし、検出されたバンドが薄かった場合、短時間の電気泳動を行なうとプライマーの  $^{32}\text{P}$  による標識の効率が悪いのか、副生成物が多いのか、PCR の反応自体が悪いのか判断することができる。

## II. 蛍光色素による PCR 産物の標識

放射性同位元素を使用しない場合、蛍光色素を用い

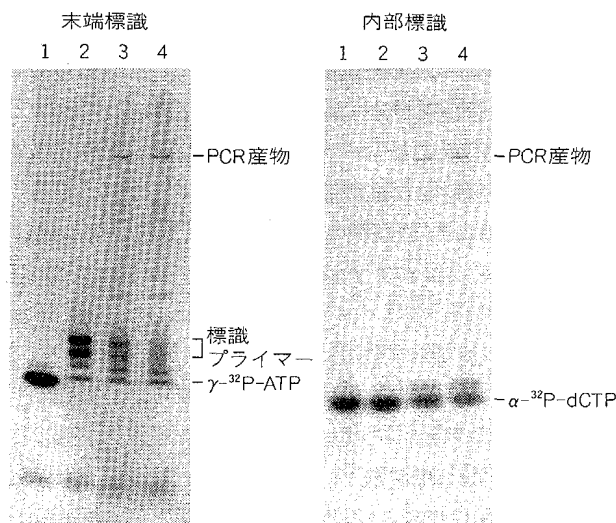


図 2 短時間の電気泳動による PCR 産物の解析  
5%ポリアクリルアミドゲル (18 cm×18 cm×0.3 mm) で BPB がゲルの全長の 1/3 ほど移動したところで泳動を終了し、DEAE 濾紙上で乾燥させた。DEAE 濾紙を用いると、分子量の小さい未反応の標識化合物も通りぬけずに濾紙に吸着させることができる。c-myc mRNA の RT-PCR 産物 (342 bp)。その他のバンドは副生成物である。レーン 1: 反応に用いた標識化合物。レーン 2, 3, 4: それぞれ 0, 30, 50 サイクル PCR を行なったあとの反応液。

ても PCR 産物の標識が可能である。放射線同位元素を用いる場合と同様に、末端標識および内部標識の両方が可能である。末端標識を行なう場合には 5' 末端を化学的に蛍光色素で修飾したプライマーを用いる。内部標識の場合には蛍光 dUTP を取り込ませるのであるが、PCR でうまく取り込まれないものもあるので、PCR で使用可能な蛍光 dUTP を用いる必要がある (キットを利用すればよい)。ここでは、蛍光標識プライマーを用いる場合について紹介する。なお、蛍光標識された PCR 産物を検出するためには蛍光イメージアナライザーやオートシーケンサーなどの装置が必要である。

### 1. 蛍光色素によるプライマーの標識

蛍光色素をプライマーに付加する方法には何種類があるが、すべて専用の試薬が販売されている。

#### A. アミノリンクを介した標識方法

DNA 合成機で、オリゴヌクレオチドの 5' 末端にアミノリンクをカップリングさせるところまでを行なう。そのあと、このアミノリンクに各種の蛍光色素をカップリングさせて蛍光標識プライマーを作製する。この方法は 1 つのプライマーに対して何種類もの蛍光色素を付加する場合に有用である。

#### B. 蛍光アミダイトを用いる方法

蛍光アミダイトを使用し、DNA 合成機上で蛍光色素を直接オリゴヌクレオチドの 5' 末端にカップリングする方法である。蛍光アミダイトは普通のアミダイトと同じ感覚で使用できる。アミノリンクを介した方法に比べ、手間がかからず簡単に蛍光標識プライマーが作製できる。

#### C. 蛍光標識されたオリゴヌクレオチドの精製

一般的には以下のようにして行なう。未反応の蛍光色素を除くため、セファデックス G50 や NAP-10 カラムを用い、ゲル濾過を行なう。蛍光色素は色がついているので目で確認できる。このワンステップできれいになる場合が多いが、蛍光色素が付加されていないオリゴヌクレオチドが多く存在する場合は OPC カートリッジ (パーキンエルマー) などを用いてさらに精製する。蛍光色素が OPC カートリッジに結合し、蛍光色素がついていないオリゴヌクレオチドは結合しないで流出する。

オリゴヌクレオチドにどの程度、蛍光色素が付加されたかを検出するために、分光光度計により吸光度の

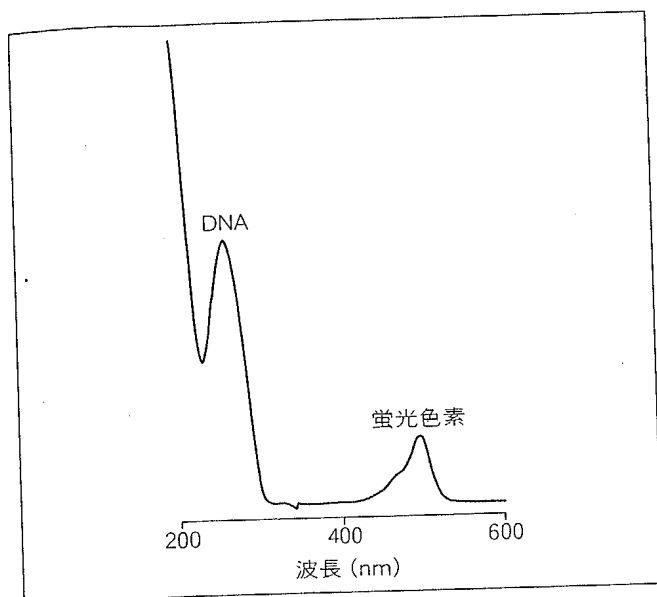


図3 フルオレセイン標識したプライマーの吸光度の分析  
合成した蛍光オリゴヌクレオチドをNAP-10カラムに通して精製し、分光光度計にて600 nmから200 nmまでスキャンした。フルオレセインの吸収は491 nm付近にある。このプライマーの場合、 $OD_{260}/OD_{491}$ の比は4.0である。

測定を行なう。蛍光色素に由来するピークの値とDNAに由来する $OD_{260}$ の値との比をとる。 $OD_{260}$ の比率が非常に高い場合は蛍光色素が付加されていないプライマーが多いことを示しており、このようなプライマーを用いると、PCR産物の検出の効率は悪くなる。蛍光プライマーの吸光度を測定した一例を図3に示す。このプライマーにはFluorePrime (ファルマシア)を用いてフルオレセインが付加されている。

## 2. 蛍光標識されたPCR産物の検出

蛍光標識されたプライマーを用いたPCRは通常のプロトコルで行なう。

蛍光色素で標識したPCR産物をオートシーケンサーを用いてPCR-SSCP解析を行なった例を図4に示す<sup>6)</sup>。*p53*遺伝子のイントロン7のDNA多型を指標に肺癌組織中でのこの遺伝子の欠失(LOH)を検索した例である。わかりやすいように $^{32}P$ で標識した場合と比較した。蛍光標識した場合も、 $^{32}P$ で標識したオートラジオグラフィーのバンドと同じパターンでピークが現われているのがわかる。また、No.1,2とも癌部にLOHが認められるが、それぞれ欠失している側に低いピークまたは薄いバンドがみられるのは、正常細胞の混入

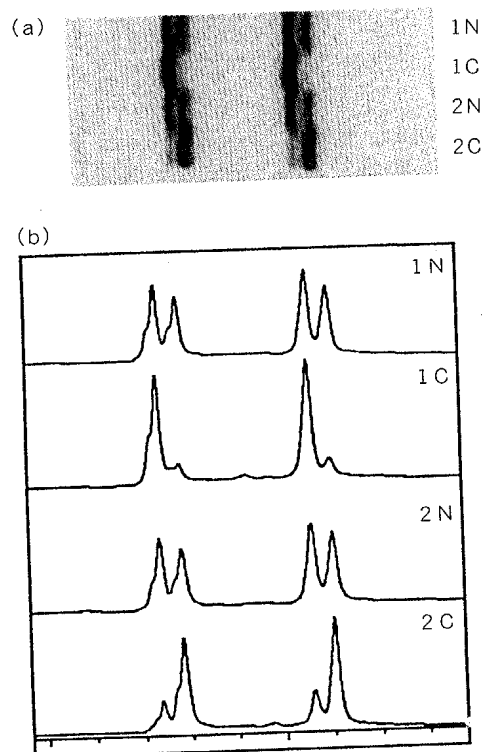


図4 蛍光標識したPCR産物の解析の例  
肺癌における*p53*遺伝子のPCR-SSCP法による解析。(a) [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] dCTPで標識したPCR産物を解析した。(b) フルオレセイン標識したPCR産物をオートシーケンサー(ALF, ファルマシア)で解析した。プライマーの配列は両者いっしょである。2検体(1,2)の肺癌(C)と同一患者の正常部(N)を並べた。

によるものである。

なお、電気泳動のときに、マーカーとして用いられるブロムフェノールブルーやキシレンシアノールなどの色素は蛍光を発し、PCR産物の検出の妨げになることもあるので、注意する。

おわりに ここでは放射性同位元素または蛍光色素によるPCR産物の標識について紹介した。放射性同位元素によるPCR産物の標識は感度がよく、コストもあまりかからずに手軽にできる反面、使用できる場所がある程度限定されてしまう。一方、蛍光色素を用いてPCR産物を標識する場合、放射性同位元素を用いる場合と同じような感度で検出を行なうことができ、さらにどのような場所でも取り扱えるが、検出には高価な装置が必要であるという弱点がある。蛍光標識されたPCR産物の検出を、より手頃なコストで行なえるシス

テムができることを期待したい。

## 文 献

- 1) Trentmann, S. M., van der Knaap, E., Kende, H. : *Science*, **267**, 1186 (1995)
- 2) Liang, P., Pardee, A. B. : *Science*, **267**, 1186-1187 (1995)
- 3) Mashiyama, S., Sekiya, T., Hayashi. K. : *Technique*, **2**, 304-306 (1990)
- 4) Makino, R., Akiyama, K., Yasuda, J., Mashiyama, S., Honda, S., Sekiya, T., Hayashi. K. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 5679-5685 (1994)
- 5) Makino, R., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **2**, 295-301 (1990)
- 6) Makino, R., Yazyu, H., Kishimoto, Y., Sekiya, T., Hayashi. K. : *PCR Methods and Applications*, **2**, 10-13 (1992)

## 増幅産物の定量

### 1 定量的PCR法

#### ——DNAの定量——

安田 純

近年の分子生物学の発展の裏には定量的解析の進歩がある。DNAやRNAの解析においても例外ではない。一方、核酸の解析の主役であるPCRに関してはその定量性についてさまざまな議論がある。本稿ではその理論的な側面についておもにふれる。

**Key words** 【定量的 PCR】

はじめに PCR法が出現する以前は特異的なDNA断片の定量にはサザンブロット法が用いられてきた。その地位は現在でも揺らいではいないが、感度が低いこと、必要とする試料の量が多いこと、手技が煩雑なことなど、適応できる分野が限られていた。PCR法の出現によって、微量なDNAが増幅・解析可能になったため、ウイルスゲノムの定量的検出などが可能になってきた<sup>1)</sup>。ここでは定量的PCR法の理論的な背景を中心に論じる。

#### I. 定量的PCRとは——絶対量が相対量か

PCRを用いて標的DNAを定量する際に、絶対量を測定する場合と、相対的差を測定する場合とがある<sup>1)</sup>。たとえば数のわかっている細胞中のウイルス粒子（またはレトロウイルスのprovirus）の数を測定するような場合は前者であり、細胞数の不明ながん組織における遺伝子増幅の検出には相対的差を調べればよいということになる<sup>1)</sup>。絶対量を測定する場合は対照として量のわかっているDNAを系列希釈して、内部標準となるDNA断片を同時に1本のチューブ内で増幅し（multiplex PCR）、内部標準を用いて補正する。検体を同じ

条件でPCRを行ない、系列希釈した対照から検量曲線を描き、検体の増幅した断片をプロットすることによって定量する<sup>2,3)</sup>。一方相対量を測定するには、解析対象のDNA断片と、内部標準のDNA断片の量の比を解析することになる<sup>4,5)</sup>。この場合は鋳型DNAのコピー数については知ることができない。

#### II. 定量的PCRの実験の組み立て——一般的な考え方

まず、DNAの定量であるが、とくに絶対量を測定する場合に検量曲線を描くための鋳型DNAの定量は慎重に行なう必要があると思われる。また検体のDNA量も同様であるが、培養細胞、末梢血リンパ球など元の細胞数が確認できる場合はそれらの値をそろえることがよい結果につながると思われる。

次にPCR産物の標識法であるが、大きく分けるとRI標識と、非RI標識に分けられる。RI標識ではプライマー標識法とPCR時の産物へのRIヌクレオチドの取り込みによる標識法とに分けられる。RIの定量についてはさまざまな方法があるが、筆者らは富士フイルムのBAS2000システムを用いている。これはRIの放射能を蛍光物質を含有するイメージングプレートを用い

て検出し、コンピュータを用いて解析するもので、X線フィルムに比べてきわめて高感度で、広い範囲で直線的な特性曲線を有する。またX線フィルムを用いた測定系としてはいわゆるデンストメーターが存在する。これは通常 CCD カメラを搭載した透過型スキャナーでX線フィルムを走査し、デジタル化した情報をコンピュータに取り込んで解析するものである。これもX線フィルムの特性曲線が直線となる範囲で定量性の高い解析が可能である。

非 RI 系の DNA 標識としては、ビオチン標識、蛍光物質標識、エチジウムブロミド染色などがある。たとえば、蛍光物質標識の場合、いわゆる自動シーケンサーを用いれば簡単に定量が可能である<sup>6)</sup>。とくにエチジウムブロミド染色の場合、アガロースゲルよりはポリアクリルアミドゲルのほうがきれいな結果が得られる<sup>4)</sup>。

PCR はそのサイクルを重ねるごとに DNA 断片の増幅効率が低下し、飽和状態になるので、比較的少ないサイクルで実験を行なう<sup>7)</sup>。ヒトゲノム DNA 20 ng を鋳型として PCR を行なった場合、20~25 サイクルのあたりから効率が落ちる (片対数のグラフで傾きが小さくなる: 図 1)。そこで実際にはどのあたりが飽和点かを見極める必要がある。そのうえで実際の解析を行な

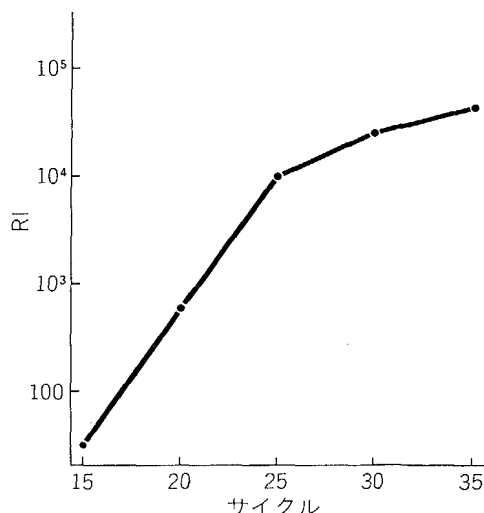


図 1 サイクル数と PCR の産物量の比較

ヒト末梢血リンパ球 DNA を鋳型とした、断片 C4 (本文参照) を増幅した PCR。横軸がサイクル数で縦軸が PCR 産物の放射能の量 (対数表示) である。単位は BAS2000 で用いている PSL 単位である。グラフにみるように、25 サイクルを境にしてグラフの傾きが小さくなっている。

うべきである。

また、後に述べるように内部対照なしに定量的 PCR は困難であるが<sup>1,8)</sup>、その取り方にはいくつかある。

① 解析対照断片の PCR によって同時に鋳型 DNA の他の場所から増幅されるサブバンド [LS-PCR (low stringency PCR)<sup>9)</sup>, AP-PCR (arbitrarily primed PCR)<sup>10)</sup> など]。② 人工的に合成した解析対象とよく似た鋳型となる DNA (gene-dosage PCR<sup>11)</sup> など)。③ 鋳型 DNA の他の部位を増幅するプライマーセット (multiplex PCR など)。

これらのうち、どれも条件設定が簡単ではないので、状況に応じて使い分ける必要がある。

### III. がん組織における遺伝子増幅の簡単な検出

ここではがんにおいて増幅が予想される遺伝子断片 (解析対象) とがんでも変異を示さないとと思われる断片 (内部標準) とを multiplex PCR で増幅し、正常組織との差を見ることによって実際に遺伝子の増幅が検出できた例を示す (図 2)。この実験の目的は相対的な差を見るもので絶対的な差を解析する実験法としては文献<sup>2,3)</sup>を参照されたい。以下の例は大腸がんにおいて、増幅が予想される断片 (C4: 第 20 染色体由来) と変化していないと予想される断片 (C2: 第 10 染色体由来) を用いた実験系である。

#### 1. PCR

ヒトゲノム DNA (20 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR 緩衝液	2 $\mu$ l
C2 特異的プライマー (左右各 50 $\mu$ M) 各	2 $\mu$ l
C4 特異的プライマー (左右各 10 $\mu$ M) 各	2 $\mu$ l
2.5 mM 各 dNTP	1 $\mu$ l
Taq ポリメラーゼ	0.2 unit
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP	2 $\mu$ Ci
蒸留水	8 $\mu$ l
計	20 $\mu$ l

サイクルは 94°C 5 分の反応ののち、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分をくり返して 19 回目と 21 回目をサンプリングして、反応液 1  $\mu$ l を 10  $\mu$ l の 1 $\times$ STOP dye (5%グリセロール, 0.1% SDS, 100 mM EDTA, 0.05%プロモフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール) で希釈する。

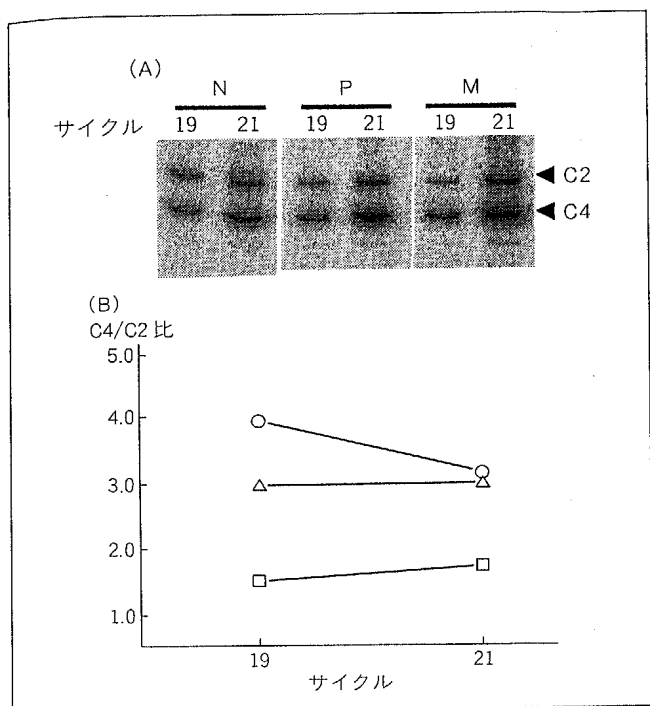


図 2 がんにおける遺伝子増幅の検出

(A) 競合的 PCR による DNA 断片間の相対的量比の検討。進行大腸がん患者の正常組織 (N)、原発巣 (P)、転移巣 (M) 由来のゲノム DNA を鋳型として C4 断片 (解析対象) と C2 断片 (内部標準) にそれぞれ特異的なプライマーセットを用いて PCR を同時に 1 本のチューブで行なった。(B) C4 断片 (解析対象) と C2 断片 (内部標準) の比の試料間における違い。横軸がサイクル数、縦軸が C4/C2 比である。□が正常組織、△が原発巣、○が転移巣である。C4 と C2 では C4 のほうが PCR の効率がよいため、完全な定量的な実験ではないが、C4/C2 比を腫瘍組織と正常組織で比較すると明らかに腫瘍組織のほうが大きく、C4 断片が腫瘍組織中で増幅していることが認められる。

## 2. 電気泳動

5%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=99:1)電気泳動を行なう。緩衝液は 0.5×TBE を用いる。適当なところで電気泳動を止め、ゲルを乾燥後、BAS2000 システムで各 PCR 産物を定量し解析する。

## IV. 定量的 PCR の問題点——内部標準のジレンマ

定量的 PCR においては内部標準の存在がきわめて重要である。ある検体において PCR 産物が得られなかった場合、それが鋳型 DNA 断片が検体中に存在しないためなのか、PCR がうまくいかなかったためなのかを鑑別するためには内部標準が必要である。さらには実験

につきまとうさまざまな誤差 (ピペット操作に伴う誤差など) を校正することも内部標準が可能にする。そのために定量的 PCR の場合は内部標準を用いた競合的 PCR が必須の要素となっている。しかし、内部標準に関してはさまざまな議論がある。

最近 Raeymaekers<sup>12,13)</sup>らが競合的 PCR の内部標準について理論的な考察をしている。それによると解析対象の DNA 断片の増幅効率と内部標準 (競合物) の増幅効率がわずかに違っても多数の PCR サイクルの後にはその食い違いはきわめて大きくなることが予想される。この考えに従えば、解析対象と内部標準の増幅効率がほぼ同じになるように内部標準を設定しなければならない。このような考え方に基づくと、ランダムに解析対象と増幅効率が等しいような内部標準を選ぶことは困難である。そのため、同一のプライマーセットを用い、鎖長のわずかな違いなどで鑑別できるような人工的な DNA 断片を内部標準として添加するような実験系が開発されている<sup>14)</sup>。そのような意味あいで AP-PCR, LS-PCR に関しては同一のプライマー(セット)を用いて複数の産物を得るため有用な方法と思われる。しかし、これらの非特異的 PCR は特異的な PCR 産物を得るには不向きであり、適用できる範囲が限られている。また、ゲノム解析で用いられている PCR による多型マーカーを用いた解析で観察される対立遺伝子でヘテロ接合性のものは互いに内部標準となりうる。この場合はたとえばダウン症候群(第 21 染色体のトリソミー)の診断などでは有効であると思われる (がん組織でのヘテロ接合性の消失の解析の場合は別)。

しかし、定量的 PCR と称して multiplex PCR を用いているような研究論文で上記のような細かな議論に立ち入っているものは少ない<sup>11,12~14)</sup>。一つには多くの場合正確な定量よりは内部標準との差で議論が可能なのが多いためと思われる。ある実験書ではプライマー濃度を含めた PCR 反応のパラメーターをそれぞれに調節するべきとあり、場合によっては本稿で紹介したようにたとえば解析対照のプライマー濃度を内部標準の 5~10 倍にするような場合もある<sup>4)</sup>。しかし、もし厳密に実験を進めるとすれば上記のような問題点を考えあわせて実験を組み立てる必要かあると思われる。

おわりに ここでは実際の実験手法よりは考え方を中



心に議論したが、最近 RNA の PCR を用いた定量に関してインターネット上で白熱した議論が展開された(詳細は文献 14 参照)。そうした点から今後はより厳密な実験の組み立てが要求される可能性がある。

## 文 献

- 1) Ferrè, F., Marchese, A., Pezzoli, P., Griffin, S., Buxton, E., Boyer, V. : *in* The polymerase chain reaction (ed. Mullis, K. B., Ferrè, F., Gibbs, R. A.), pp. 67-88, Birkhäuser, Boston (1994)
- 2) Cohen, D. M. : *in* The polymerase chain reaction (ed. Mullis, K. B., Ferrè, F., Gibbs, R. A.), pp. 89-96, Birkhäuser, Boston (1994)
- 3) Cohen, D. M. : *in* Current protocols in molecular biology (ed. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.) Vol. 2, pp. 15.3.1-15.3.8, Wiley Interscience, New York (1987)
- 4) Wasson, J. C. : *in* Current protocols in human genetics (ed. Dracopoli, N. C., Haines, J. L., Korf, B. R., Moir, D. T., Morton, C. C., Seidman, J. G., Smith, D. R.) Vol. 2, pp. 10.5.8-10.5.18, Wiley Interscience, New York (1994)
- 5) Sonoda, Y., Yoshimoto, T., Sekiya, T. : *Oncogene*, **11**, 2145-2149 (1995)
- 6) Makino, R., Yazyu, H., Kishimoto, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *PCR Methods and Applications*, **2**, 10-13 (1992)
- 7) Makino, R., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **2**, 295-301 (1990)
- 8) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Nature*, **359**, 557-558 (1992)
- 9) Caballero, O. L., Villa, L. L., Simpson, A. J. G. : *Nucl. Acids Res.*, **23**, 192-193 (1995)
- 10) Perucho, M., Welsh, J., Peinado, M. A., Ionov, Y., McClelland, M. : *in* "Methods in Enzymology" vol. 254, pp. 275-290, Academic Press, Orland (1995)
- 11) Celi, F. S., Cohen, M. M., Antonarakis, S. E., Wertheimer, E., Roth, J., Shuldiner, A. R. : *Genomics*, **21**, 304-310 (1994)
- 12) Raeymaekers, L. : *Genome Research*, **5**, 91-94 (1995)
- 13) Raeymaekers, L. : *Analytical Biochemistry*, **214**, 582-585 (1993)
- 14) Hengen, P. N. : *Trends in Biological Sciences*, **20**, 476-477 (1995)